

17. 鉄欠乏環境における尿路病原性大腸菌 (UPEC) の膀胱上皮細胞侵入とマイクロコロニー形成促進機構

倉林久美子¹, 富田 治芳^{2,3}, 平川 秀忠¹

(1 群馬大・先端科学者育成ユニット)

(2 群馬大院・医・細菌学)

(3 群馬大院・附属薬剤耐性菌実験施設)

UPEC は、尿路感染症の主要な起因菌であり、膀胱上皮細胞へ付着・侵入し、IBC (Intracellular Bacterial Community) と呼ばれるマイクロコロニーを形成する。この機構が、UPEC 感染症難治化の原因の 1 つであると考えられている。我々は、膀胱上皮細胞侵入とマイクロコロニー形成を誘導する条件、並びにその分子機構を解明することを目指している。

我々は、鉄欠乏環境において UPEC の膀胱上皮細胞への侵入並びに、マイクロコロニー形成能が増大することを発見した。fur 遺伝子欠損及び、鉄キレート剤添加により UPEC の鉄利用能を人為的に阻害させると、膀胱上皮細胞への付着・侵入菌数が増大した。それに関連し、細胞内でより高密度、高頻度の UPEC のマイクロコロニーが確認された。さらに、上記の条件では UPEC の I 型線毛の発現増大が認められた。

以上の結果から、UPEC にとって鉄が欠乏すると I 型線毛の発現増大に伴い、膀胱上皮細胞への付着・侵入、マイクロコロニー形成能が増大することが示された。尿路感染部位において、宿主細胞との鉄獲得の競合や自然免疫因子のリポカリンなどによって、UPEC が利用できる鉄が枯渇しがちである。そのため、UPEC は感染部位において、積極的に宿主細胞内でマイクロコロニーを形成することで、自らドーマント状態を作り出し、鉄飢餓によるストレスを回避しているのではないかと推測される。

18. 眼内液由来の微量な DNA をもちいた次世代シーケンサーによるヒトサイトメガロウイルス全ゲノム解析の試み

細貝 真弓^{1,2}, 中谷 陽子², 高瀬 博³

杉田 直⁴, 秋山 英雄¹

(1 群馬大医・附属病院・眼科)

(2 群馬大院・医・分子予防医学)

(3 東京医科歯科大学医学部附属病院 眼科)

(4 理化学研究所 多細胞システム形成研究センター)

【目 的】 サイトメガロウイルス (CMV) は、免疫不全状態で再活性化して網膜炎などの日和見感染症をおこすことが知られてきたが、免疫正常者での角膜内皮炎や虹彩炎にも関与することが報告されている。背景が異なる患者に発症する一因として、CMV の遺伝子型が異なる可能性を推測した。そこでまず、眼内液由来の微量な DNA で次世代シーケンサーによる CMV 全ゲノム解析が可能かどうかを検討

した。【対象と方法】 東京医科歯科大学での PCR で CMV ゲノムが検出された 6 検体 (前房水 4 検体, 硝子体液 2 検体) の保存 DNA を対象とした。最終診断は CMV 網膜炎 3 例, CMV 虹彩炎 2 例, CMV 角膜内皮炎 1 例で, CMV コピー数は $4.25 \times 10^2 \sim 1.05 \times 10^7$ コピー/ml だった。Ovation[®] SP+Ultralow DR Multiplex System 1-8 キット (タカラバイオ) によりシーケンスライブラリを作製し、イルミナ社 Mi Seq シーケンサーを用いて、75-base paired-end read シーケンシングを 1 ラン施行した。リードトリミング後に、リファレンスゲノム (ヒト CMV Merlin 株, GenBank: AY446894) にマッピングした。【結 果】 ライブラリ作製に使用した DNA 量は 0.27~20.00 ng で、0.27 ng のサンプル以外からシーケンスライブラリを作製できた。この中から 8 つのライブラリを選び、全てのシーケンスデータが得られた。マップ率は 0.011%~0.063% と低値で、カバレッジが 8 倍以上のサンプルは CMV コピー数が 10^5 コピー/ml 以上の検体だった。【結 論】 今回の方法では、微量 DNA の検体からもシーケンスライブラリの作製が可能で、DNA 量の下限値はおおよそ 0.3~1 ng と考えられた。また、全ゲノム解析をするための CMV コピー数は 10^5 コピー/ml 以上必要であることが示唆された。

19. Trypanosoma cruzi 感染細胞における宿主オートファジー標的認識について

植松 亜美¹, 新城 翔子¹, 瀬戸 絵理²

鬼塚 陽子¹, 嶋田 淳子¹

(1 群馬大院・保・生体情報検査科学)

(2 群馬大院・医・分子予防医学)

【背 景】 細胞内寄生原虫 *Trypanosoma cruzi* は、病原体排除機構の一つであるオートファジーにより排除されず、オートファジーを回避する機序を持っていると考えられる。通常、細胞内に侵入した病原体は隔離膜に包み込まれオートファゴソームが形成される。病原体などの標的がオートファゴソームに包まれるためには、ユビキチン (Ub) 化された標的がアダプター分子 p62 を介してオートファジー関連タンパク質 LC3 と結合することが必要である。

これまでの研究で *T. cruzi* 感染細胞ではオートファゴソーム形成が抑制されることを明らかにした。本研究では、*T. cruzi* がオートファゴソームの標的として認識される機構について検討することを目的とする。【方 法】 ヒト線維肉腫細胞 HT1080 に、LC3 と GFP を融合した遺伝子 (GFP-LC3) をトランスフェクションし、GFP-LC3 発現細胞を樹立した。*T. cruzi* 感染、またはアミノ酸飢餓によりオートファジーを誘導した。これらの細胞を用い、LC3, Ub, p62 の局在を調べるため、蛍光抗体法を用いた細胞染色を行った。【結果と考察】 *T. cruzi* 感染、アミノ酸飢餓処理した細胞ではいずれも、LC3 と Ub の輝点の増加が見られ、共局在していた。この結果は、標的となる分子が Ub 化され、隔離膜に局在する LC3 と結合していることを